壳寡糖对脂多糖诱导猪空肠上皮细胞氧化损伤的作用

肖定福[1]　钟　佳[1]　刘进辉[2]　李文平[2*]

（1.湖南农业大学动物科学技术学院，长沙 410128；2.湖南农业大学动物医学院，长沙 410128）

摘　要：本试验旨在通过脂多糖（LPS）诱导猪空肠上皮细胞（IPEC-J2）来建立氧化应激模型，探讨壳寡糖（COS）的抗氧化作用效果。采用噻唑蓝（MTT）法检测 LPS 和 COS 对 IPEC-J2 作用 12、24、48 h 后，细胞增殖活性的变化；选择适宜浓度 LPS（1.0 μg/mL）和 COS（200 μg/mL）作用于 IPEC-J2，分为对照组、LPS 组、COS 组、LPS+COS 组。采用 Western Blot 法检测核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)蛋白的表达；试剂盒检测超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）活性及丙二醛（MDA）的含量。结果表明： 1.0 μg/mL 的 LPS 对 IPEC-J2 作用 24 h，细胞增殖的抑制率为 41.6%，为造模的最适浓度和作用时间；COS 在一定浓度范围内对 IPEC-J2 有增殖作用，其浓度为 200 μg/mL 时效果最佳，作用时间为 24 h 时，细胞增殖率达到 126.3%。LPS+COS 组较对照组的 SOD、CAT 活性和 MDA 含量差异不显著（$P>0.05$），Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量显著升高（$P<0.05$）；LPS+COS 组较 LPS 组的 Nrf2 蛋白相对表达量显著升高（$P<0.05$），HO-1 有升高趋势，但差异不显著（$P>0.05$），SOD、CAT 活性显著升高（$P<0.05$），MDA 含量显著降低（$P<0.05$）。由此可见，LPS 诱导 IPEC-J2 氧化应激，而 COS 可进一步促进 Nrf2 和 HO-1 蛋白的高表达，并提高抗氧化酶的活性，降低氧化产物含量，从而增强细胞对氧化应激的抵抗力，起到保护作用。

关键词：壳寡糖；脂多糖；猪空肠上皮细胞；氧化应激；抗氧化作用

中图分类号：S811.3　　　　文献标识码：　　　　　文章编号：

氧化应激是机体自由基生成增加或（和）清除能力降低，导致机体氧化和抗氧化两者失衡，自由基大量累积造成机体损伤[1]。肠道黏膜是宿主防御病原微生物的第一道防线，而肠上皮细胞是肠道黏膜屏障的重要组成部分，肠上皮细胞的损伤是肠功能障碍的重要病理基础。在多种生理、病理、饮食或环境不当等情况下，肠上皮细胞都能产生严重的氧化应激，过多的自由基的累积可导致肠上皮细胞受损，从而发生肠功能障碍[2]。壳寡糖（chitooligosaccharide,COS）是壳聚糖（chitosan,CTS）生物降解后的产物，水溶性好，具有

收稿日期：2016-01-07

基金项目：国家自然科学基金青年项目（31301985）；中国博士后科学基金项目（2014M562111，2015T80871）；湖南省科技厅项目（2015RS4035）

作者简介：肖定福（1977-），女，湖南娄底人，副教授，博士，研究方向为单胃动物营养。E-mail：xiaodingfu2001@163.com。

*通信作者：李文平，教授，硕士生导师，E-mail： liwenping7222@163.com

多种生物功效，如抗癌[3]、增强免疫[4-5]、抗氧化[6-8]、促生长[9]和抑菌[10]等，是一种具有广阔前景的天然产品。本项目研究通过建立猪空肠上皮细胞氧化应激模型，来探讨 COS 的抗氧化活性及作用机理，为其临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

猪空肠上皮细胞（IPEC-J2）由中科院亚热带农业生态研究所提供；COS（90%脱乙酰度，平均分子质量<5 000 u）由中国科学院大连化学物理研究所提供；脂多糖（lipopolysaccharide,LPS）[大肠杆菌（*Escherichia coli*）O55:B5]购于 Sigma 公司，10 mg/支；核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)抗体（C-20）、血红素氧合酶-1(HO-1)抗体（C-105）均购自圣克鲁斯生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

IPEC-J2 于含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM basic（1×）培养基中，在 37 ℃、5% CO_2、90%相对湿度的培养箱中培养，隔天换液，待细胞贴壁生长到 80%~90%时进行传代。

1.3 噻唑蓝（MTT）法检测细胞活率

取对数生长期的 IPEC-J2 调整至 5×10^4/孔接种于 96 孔板中，每孔 200 μL，置于培养箱中培养 24 h，换无血清培养基，并分别加不同浓度的 LPS（0、0.1、1.0、10.0 μg/mL）和 COS（0、50、100、200、400 μg/mL）继续培养 12、24、48 h，每组设置 6 个复孔，到时间点后分别加 5 mg/mL 的 MTT 20 μL 继续置于培养箱中孵育 4 h，小心吸弃上清，用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次，每孔加 150 μL 二甲基亚砜（DMSO）室温摇晃 15 min，使蓝紫色结晶充分溶解，用酶联免疫检测仪测定各孔在 490 nm 波长处的吸光值。试验重复 3 次。

1.4 细胞样品收集

取对数生长期的 IPEC-J2 调整至 1×10^6/孔接种于 6 孔板中，待细胞贴壁生长至 80%左右，进行加样作用 24 h，试验分为对照组（不加 LPS 和 COS）、1.0 μg/mL LPS 组、200 μg/mL COS 组、1 μg/mL LPS+200 μg/mL COS 组，作用完后，用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次，加入细胞裂解液，于冰上裂解 30 min，用细胞刮棒刮取细胞，转移至离心管中，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，取上清，用二辛可宁酸（BCA）法蛋白定量，分装于-80 ℃保存备用。

1.5 Western Blot 检测蛋白表达

取蛋白样品，用十二烷基硫酸钠-聚丙稀酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）法分离蛋白，将电泳分离的蛋白转移到偏二氟乙烯（PVDF）膜上，再用 5%的脱脂奶粉室温缓慢摇荡封闭 2 h，分别加入兔抗 Nrf2、HO-1（1:1 000 稀释）于 4 ℃下孵育过夜，经磷酸盐吐温缓冲液（TBST）洗涤 3 次（5 min/次）后，再用辣根酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G（IgG）（1:5 000 稀释）

室温孵育 2 h，经 TBST 洗涤 3 次（5 min/次），与化学发光剂反应 1 min，在 Image Quant LAS 4 000 mini 化学发光成像仪下显示并记录结果。试验以 β 微管蛋白（β-tubulin）作为内参，试验重复 3 次。

1.6　抗氧化酶及氧化产物的检测

取细胞样品，采用硫代巴比妥酸比色法检测丙二醛（MDA）含量，钼酸铵比色法检测过氧化氢酶（CAT）活性，黄嘌呤氧化酶比色法检测超氧化物歧化酶（SOD）活性，试剂盒均购自南京建成生物工程研究所，其试验操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.7　统计分析

试验数据采用 SPSS 19.0 统计分析软件的 *t* 检验法进行单因素方差分析比较，以 $P<0.05$ 为差异显著，结果用平均值±标准误表示。

2　结果与分析

2.1　LPS 对 IPEC-J2 增殖活性的抑制作用

由表 1 可见，不同浓度的 LPS 对 IPEC-J2 增殖活性的抑制作用有一定的差异，且具有一定的时间依赖性。LPS 浓度在 0.1 μg/mL 时，对细胞的抑制作用较低，作用 12、24 h 时与对照组（不加 LPS）无显著差异（$P>0.05$)；LPS 浓度在 1.0 μg/mL 时，对细胞有一定的抑制作用，作用 24、48 h 时与对照组差异显著和极显著（$P<0.05$ 和 $P<0.01$），作用 24 h 时，细胞增殖活性抑制率为 41.6%，为造模的最佳作用浓度和时间；LPS 浓度为 10.0 μg/mL 时，对细胞的损伤严重，细胞活率很低，与对照组差异极显著（$P<0.01$）。

表 1　LPS 对 IPEC-J2 细胞增殖的影响

Table 1　Effects of LPS on IPEC-J2 proliferation　（*n*=6）

LPS 浓度	OD 值 OD value		
LPS concentration/(μg/mL)	12 h	24 h	48 h
0 (对照 Control)	0.212±0.007	0.331±0.011	0.333±0.015
0.1	0.207±0.022	0.303±0.019	0.297±0.023*
1.0	0.199±0.009	0.217±0.008*	0.201±0.037**
10.0	0.107±0.025**	0.103±0.013**	0.097±0.010**

*表示与对照组比较差异显著（$P<0.05$）；**表示与对照组比较差异极显著（$P<0.01$）。表 2 同。

* means significant difference compared with the control group ($P<0.05$); ** means extremely significant difference compared with the control group ($P<0.01$). The same as Table 2.

2.2　COS 对 IPEC-J2 增殖活性的促进作用

由表 2 可见，不同浓度的 COS 对 IPEC-J2 增殖活性的促进作用不同，而同一浓度的 COS 对细胞的增殖作用也具有一定的时间依赖性。与对照组相比，COS 浓度为 50 μg/mL 时，对细胞增殖的影响不显著（*P*>0.05)；COS 浓度为 100 μg/mL 时，作用 24、48 h 时对细胞增殖的影响显著（*P*<0.05）；COS 浓度为 200 μg/mL 和 400 μg/mL 时，作用 24、48 h 时对细胞的增殖率显著提高（*P*<0.05），且在 COS 浓度为 200 μg/mL 时相对效果更好。

表 2　COS 对 IPEC-J2 增殖的影响

Table 2　Effects of COS on IPEC-J2 proliferation　（*n*=6）

COS 浓度 COS concentration/(μg/mL)	OD 值 OD value		
	12 h	24 h	48 h
0 (对照 Control)	0.212±0.007	0.331±0.011	0.333±0.015
50	0.207±0.009	0.337±0.013	0.346±0.010
100	0.237±0.012	0.396±0.024*	0.411±0.011*
200	0.241±0.008	0.403±0.007*	0.427±0.018*
400	0.255±0.019	0.393±0.010*	0.392±0.021*

2.3　Nrf2 和 HO-1 蛋白的相对表达量

由表 3 得知，LPS 组的 Nrf2 和 HO-1 蛋白的相对表达量较对照组都有显著提高（*P*<0.05)；LPS+COS 组的 Nrf2 和 HO-1 蛋白的相对表达量较 LPS 组进一步提高，且 Nrf2 蛋白的相对表达量显著高于 LPS 组（*P*<0.05），但 HO-1 蛋白相对表达量与 LPS 组差异不显著（*P*>0.05）。

表 3　Nrf2 和 HO-1 蛋白在各细胞组中的相对表达量

Table 3　The relative expression level of Nrf2 and HO-1 protein in each cell group (*n*=5)

项目 Items	对照组 Control group	LPS 组 LPS group	COS 组 COS group	LPS+COS 组 LPS+COS group
核因子 E2 相关因子 2 Nrf2	0.395±0.088	0.989±0.089[a]	0.546±0.051	1.377±0.103[ab]
血红素氧合酶-1 HO-1	0.237±0.061	0.546±0.145[a]	0.250±0.017	0.630±0.081[a]

[a] 表示与对照组比较差异显著（*P*<0.05）；[b] 表示与 LPS 组比较差异显著（*P*<0.05）。下表同。

[a] means significant difference compared with the control group　（*P*<0.05）; [b] means significant difference compared with the LPS group　（*P*<0.05）. The same as below.

2.4　SOD、CAT 活性和 MDA 含量

由表 4 可知，LPS 组较对照组的 SOD、CAT 活性显著降低（*P*<0.05），MDA 含量显著

升高（$P<0.05$）；LPS+COS 组较 LPS 组的 SOD、CAT 活性显著升高（$P<0.05$），MDA 含量显著降低（$P<0.05$），较对照组各项差异不显著（$P>0.05$）。

表 4　各细胞组中 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的检测结果

Table 4　The test results of SOD, CAT activities and MDA content in each cell group　（n=6）

项目 Items	对照组 Control group	LPS 组 LPS group	COS 组 COS group	LPS+COS 组 LPS+COS group
超氧化物歧化酶 SOD	101.43±4.31	87.34±1.64^{a}	109.44±1.09	97.87±6.03^{b}
过氧化氢酶 CAT	9.83±0.18	4.24±0.50^{a}	10.13±0.42	7.57±0.80^{b}
丙二醛 MDA	1.07±0.06	1.77±0.29^{a}	1.10±0.64	1.21±0.40^{b}

3　讨　论

如今，天然活性物质越来越受到各行各业的关注，已成为“高效、绿色、安全”的代名词。COS 来源丰富，广泛存在于低等动植物中，如甲壳动物外壳、藻类的细胞壁等[11]。在体外和体内的大量研究报道，COS 在抗氧化方面发挥着重要的作用，具有清除氧自由基、降低氧化产物含量、提高抗氧化酶活性等功能[12-17]。本研究除了进一步验证 COS 对抗氧化酶活性及氧化产物含量的影响，也探讨了 COS 对抗氧化反应信号通路 Keap1-Nrf2/抗氧化反应元件（ARE）中的核心成员 Nrf2 及其下游因子 HO-1 的作用，从而揭示 COS 抗氧化作用的可能信号通路或靶点。

LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁中的成分，当细菌细胞壁被破坏而释放出来，是内毒素中的一种，也是一种典型的肠毒素。LPS 能刺激机体产生大量的活性氧自由基，从而导致机体氧化应激、炎症等一系列反应。用 LPS 诱导氧化应激模型具有实际意义，在许多研究中得到应用和探讨，如王晓等[18]用 LPS 成功建立了大鼠胰岛细胞氧化应激模型，进一步探讨了α-硫辛酸的抗氧化和抗凋亡的作用机制；又如齐策等[19]用 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞氧化应激模型，通过检测细胞的脂质过氧化程度，从而探究了维生素 C-磷脂复合物的抗氧化作用。

Nrf2 在机体绝大部分组织中表达，是调控机体细胞、组织及器官中氧化还原平衡的主要组成部分，当 Nrf2 被活化入核后，能与 ARE 识别并结合，然后启动下游一系列解毒和抗氧化因子的基因表达，如醌氧化还原酶-1（*NQO*1）、谷胱甘肽硫转移酶（*GST*）、*SOD*、*CAT*、还原性谷胱甘肽（*GSH*）等，而这些基因的表达都与机体的抗氧化活性有极其重要的关联，对机体的氧化还原平衡有关键性的作用[20-21]。HO-1 又称为热休克蛋白 32，可以被多种物质或刺激因素诱导表达，如热休克、缺血、辐射、低氧、高氧、重金属盐等，发挥强大

的细胞保护作用，HO-1 的细胞保护作用主要与它的催化分解产物一氧化碳、胆绿素、胆红素、亚铁离子有关，其中，胆绿素、胆红素、亚铁离子与抗氧化的作用有紧密联系[22]，而研究发现，Nrf2 是调控 *HO*-1 表达的一种重要的蛋白合成信号因子[23-24]。

从试验结果分析，LPS 诱导 IPEC-J2 氧化应激，Nrf2 被激活，并进一步诱导下游 HO-1 的表达，对细胞起到一定的保护作用，但这种保护作用不足以抵抗细胞的氧化损伤，细胞的抗氧化酶（SOD、CAT）活性降低，抗氧化产物（MDA）增多；而 COS 能进一步促使 Nrf2 高表达，并诱导下游基因 *HO*-1 表达，提高抗氧化酶（ SOD、CAT）活性，同时降低抗氧化产物（MDA）含量，增强了细胞对氧化应激的耐受能力，从而对细胞起到保护能力。所以，从试验结果可以推测 COS 的抗氧化作用与抗氧化反应信号通路 Nrf2/ARE 及 HO-1 有一定的关联。

4 结 论

LPS 诱导 IPEC-J2 细胞氧化应激，而 COS 可进一步促进 Nrf2 和 HO-1 蛋白的高表达，并提高抗氧化酶的活性，降低氧化产物含量，从而增强细胞对氧化应激的抵抗力，起到保护作用。

参考文献：

[1] SOHAL R S,ALLEN R G.Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging:a unifying hypothesis[J].Experimental Gerontology,1990,25(6):499–525.

[2] TANG J,JIANG Y,TANG Y,et al.Effects of propofol on damage of rat intestinal epithelial cells induced by heat stress and lipopolysaccharides[J].Brazilian Journal of Medical and Biological Research,2013,46(6):507–512.

[3] CHUA B Y,KOBAISI M A,ZENG W G,et al.Chitosan microparticles and nanoparticles as biocompatible delivery vehicles for peptide and protein-based immunocontraceptive vaccines[J].Molecular Pharmaceutics,2012,9(1):81–90.

[4] YIN Y L,TANG Z R,SUN Z H,et al.Effect of galacto-mannan-oligosaccharides or chitosan supplementation on cytoimmunity and humoral immunity in early-weaned piglets [J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2008,21(5):723–731.

[5] SHARMA S,MUKKUR T K S,BENSON H A E,et al.Enhanced immune response against pertussis toxoid by IgA-loaded chitosan-dextran sulfate nanoparticles[J].Journal of Pharmaceutical Sciences,2012,101(1):233–244.

[6] 肖定福,唐志如,印遇龙,等.壳聚糖对大肠杆菌攻毒仔猪生长性能和抗氧化状况的影响[J].激光生物学报,2011,20(6):741–746.

[7] 杨艳.壳寡糖,氨基葡萄糖及其衍生物的抗氧化功能研究[D].博士学位论文.青岛:中国海洋大学,2005.

[8] YAO Q,SUN T,ZHOU D X,et al.Antoioxidant activity of carboxymethyl chitosan with different substituted degrees[J].Agricultural Science & Technology,2008,9(1):5–7,59.

[9] TANG Z R,YIN Y L,NYACHOTI C M,et al.Effect of dietary supplementation of chitosan and galacto- mannan-oligosaccharide on serum parameters and the insulin-like growth factor-Ⅰ mRNA expression in early-weaned piglets[J].Domestic Animal Endocrinology,2005,28(4):430–441.

[10] CHERVINETS V M,CHERVINETS I V,BONDARENKO V M,et al.Clinical effect of chitosan in bacterial vaginosis therapy[J].Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii,2011(5):76–79.

[11] SHEPHERD R,READER S,FALSHAW A.Chitosan functional properties[J]. Glycoconjugate Journal,1997,14(4):535–542.

[12] XIE W M ,XU P X ,LIU Q .Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives[J].Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,2001,11(13):1699–1701.

[13] AHN B N, KIM J A, HIMAYA S W A,et al.Chitooligosaccharides attenuate UVB-induced damages in human dermal fibroblasts[J].Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,2012,385(1):95–102.

[14] QIAO Y,BAI X F,DU Y G.Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress[J].International Immunopharmacology, 2011,11(1):121–127.

[15] 张吉,刘洪涛,李秀英,等.壳寡糖对自由基的清除及对 N9 小胶质细胞的保护作用[J].食品科学,2010,31(7):81–85.

[16] FENG T,DU Y M,LI J,et al.Antioxidant activity of half *N*- acetylated water-soluble chitosan *in vitro*[J].European Food Research and Technology,2006,225(1):133–138.

[17] XU W,HUANG H C, LIN C J,et al.Chitooligosaccharides protect rat cortical neurons against copper induced damage by attenuating intracellular level of reactive oxygen species[J].Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,2010,20(10):3084–3088.

[18] 王晓,葛勤敏.α-硫辛酸对脂多糖诱导的大鼠胰岛细胞氧化应激和凋亡的影响[J].上海医学,2014,37(9):751–754,823.

[19] 齐策,金青哲,王兴国.维生素C-磷脂复合体抑制LPS诱导小鼠腹腔巨噬细胞氧化应激的研究[J].科技导报,2011,29(15):35–38.

[20] NIOI P,MCMAHON M,ITOH K,et al.Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene:reassessment of the ARE consensus sequence[J].Biochemical Journal,2003,374(2): 337–348.

[21] 林谦,邱磊,云龙,等.核因子 E2 相关因子 2 调控机体抗氧化途径特性及其与畜禽的健康和肉品质的关系[J].动物营养学报,2014,26(6):1421–1429.

[22] RYTER S W,OTTERBEIN L E,MORSE D, et al.Heme oxygenase /carbon monoxide signaling pathways:regulation and functional significance[J].Molecular and Cellular Biochemistry, 2002,234-235(1):249–263.

[23] ALAM J,STEWART D,TOUCHARD C,et al.Nrf2,a Cap 'n' Collar transcription factor,regulates induction of the heme oxygenase-1 Gene[J].The Journal of Biological Chemistry,1999,274(37):26071–26078.

[24] PAE H O,OH G S,JEONG S O,et al.l,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose up-regulates heme oxygenase-1 expression by stimulating Nrf2 nuclear translocation in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner in HePG2 cells[J].World Journal of Gastroenterology,2006,12(2):214–221.

Effects of Chitooligosaccharide on Lipopolysaccharide Induced Oxidative Damage in Epithelial Cells of Pig Jejunum

XIAO Dingfu[1] ZHONG Jia[1] LIU Jinhui[2] LI Wenping[2*]

(1. *College of Animal Science and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*; 2. *College of Veterinary Medicine*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*)

Abstract:This study was designed to investigate the effect of chitooligosaccharide (COS) on oxidative stress and used lipopolysaccharide (LPS) induced epithelial cells of pig jejunum (IPEC-J2) as an *in vitro* model of oxidative stress. The IPEC-J2 were incubated with LPS and COS for 12, 24 and 48 h,and then used methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide （MTT） to detect the activity of cell proliferation; the appropriate concentrations of LPS (1 μg/mL) and COS (200 μg/mL) were chosen in the IPEC-J2 cells, divided into control group, LPS group, COS group and LPS+COS group, and then detected the expression of NF-E2-related factor 2 （Nrf2） and

heme oxygenase 1（HO-1）by Western Blot; and detected superoxide dismutase (SOD), catalase （CAT） activities and malonaldehyde （MDA） content by the kit. The results showed that the optimum concentration of LPS and incubated time for model was 1 μg/mL and 24 h, the inhibition of cell proliferation was 41.6%; COS promoted the proliferation of IPEC-J2, worked the best when its concentration was 200 μg/mL and incubated 24 h, the cell proliferation rate was 126.3%. Compared with the control group, LPS+COS group was not significantly different in SOD, CAT activities and MDA content (P>0.05), but Nrf2 and HO-1 protein expression was significantly higher (P<0.05); compared with LPS group, Nrf2 protein expression of LPS+COS group was significantly higher (P<0.05), and there was an increasing trend of HO-1 protein expression, but the difference was not significant (P>0.05), SOD, CAT activities were significantly increased and MDA content was significantly reduced (P<0.05). It is concluded that LPS induce oxidative stress of IPEC-J2, but COS can induce high expression of Nrf2 and HO-1 protein, and improve the activity of antioxidant enzymes, reduce the content of oxidative products, so increase cellular resistance to oxidative stress, and play a protective role.

Key words: chitooligosaccharide; lipopolysaccharide; IPEC-J2; oxidative stress; antioxidant

*Corresponding author, professor, E-mail： liwenping7222@163.com

（责任编辑　武海龙）